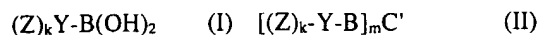


98-272943/25 B04 C07 D16 E12 J04 GLUE/ 96.11.06  
(E24) \*DE 19645601-A1  
GLUESENKAMP K 96.11.06 96DE-1045601 (98.05.07) C07F 5/04, A01N 55/08, C09B  
69/10, C09K 11/06, A61K 31/69  
New bio-specific compound boronic acid derivatives - useful for  
labelling carriers, e.g. cells or tissues, with probes under mild  
conditions,  
C98-085228  
Addnl. Data: GLUESENKAMP K, KOSEGARTEN H, STEINWEG D

Boronic acid derivatives of formula (I) and (II) are new.



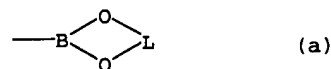
Y = optionally substituted, optionally unsaturated alkylidene  
(preferably propylidene or 2-methyltrimethylene) or substituted  
cyclic residue of a saturated, heterocyclic, alicyclic or aromatic  
(such as 1,3-phenylene or benzylene);

Z = optionally substituted biospecific compound (A), preferably with  
one or more residues of formula -D-E coupled to it;

D = substituted group as for Y;

E = B(OH)<sub>2</sub>, OB(OH)<sub>2</sub> or group of formula (a);

BC(5-B1A) D(5-A1, 5-H9) E(5-C2) J(4-B1) .1



L = T or Z';

Z' = Z having vicinal substituted or unsubstituted OH groups;

T = (preferably polymeric) carrier residue with vicinal substituted  
and/or substituted OH groups;

C' = -O-T-O-;

k, m = 1-10.

#### USE

(I) and (II) are biologically, biochemically, pharmaceutically or  
diagnostically active compounds (A), which are enzyme inhibitors,  
herbicides or pesticides, antibiotics or antimycotics, or (for (II) only)  
dyes (especially substituted fluoresceins) (all claimed). (I) and (II) are  
useful for labelling polymeric carriers T, which are plant cells, cell  
organelles, parts of these, tissues or tissue slices (all claimed), with  
(A). The plant cell membranes can be specifically labelled with probes

DE 19645601-A+

for the study of membrane properties such as pH and ion flux, e.g.  
Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> transport.

#### ADVANTAGE

Carriers can be selectively labelled under mild conditions without  
affecting the activity of (A). The adducts contain cyclic borate ester  
bonds which are very stable under physiological conditions.

#### PREPARATION

Claimed preparation of (I) involves:

- (a) incubating (A) for 1-5 hours with a substituted boronic acid  
derivative (III), preferably at room temperature, in presence of a  
polar solvent and a base (preferably triethylamine); and
- (b) adding ether to the mixture to precipitate (I), and drying.

Claimed preparation of (II) comprises preparing (I) as above, and  
esterifying with carrier T, preferably at room temperature, at pH 6-8  
(preferably 7).

#### EXAMPLE

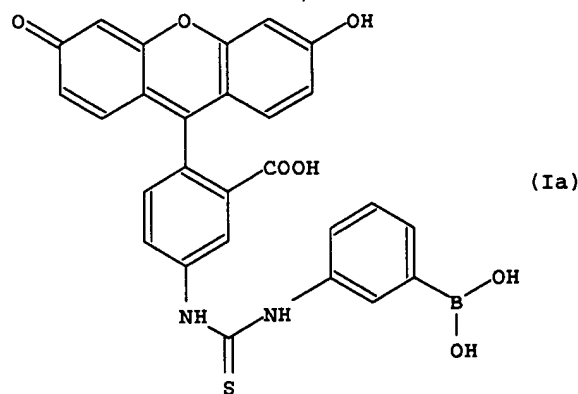
A stirred mixture of 0.173g aminobenzene-boronic acid  
hydrochloride, 0.389g fluorescein isothiocyanate (FITC) and 20 ml  
DMF was treated with 1 equivalent of NEt<sub>3</sub>. After 5 hours, the product

was precipitated in ether, washed with ether and dried to give 0.5g  
(93%) of the adduct of formula (Ia).

Cultured wheat root cell samples were incubated for 1-12 hours in  
the dark with various concentrations of (Ia) or non-derivatised FITC  
(10-100 mM in PBS). After washing, the samples were compared  
using a confocal laser microscope (excitation 490 nm, fluorescence  
600 nm). Samples incubated with (Ia) showed a stable fluorescence  
signal, whereas those incubated with FITC did not. (LJ)

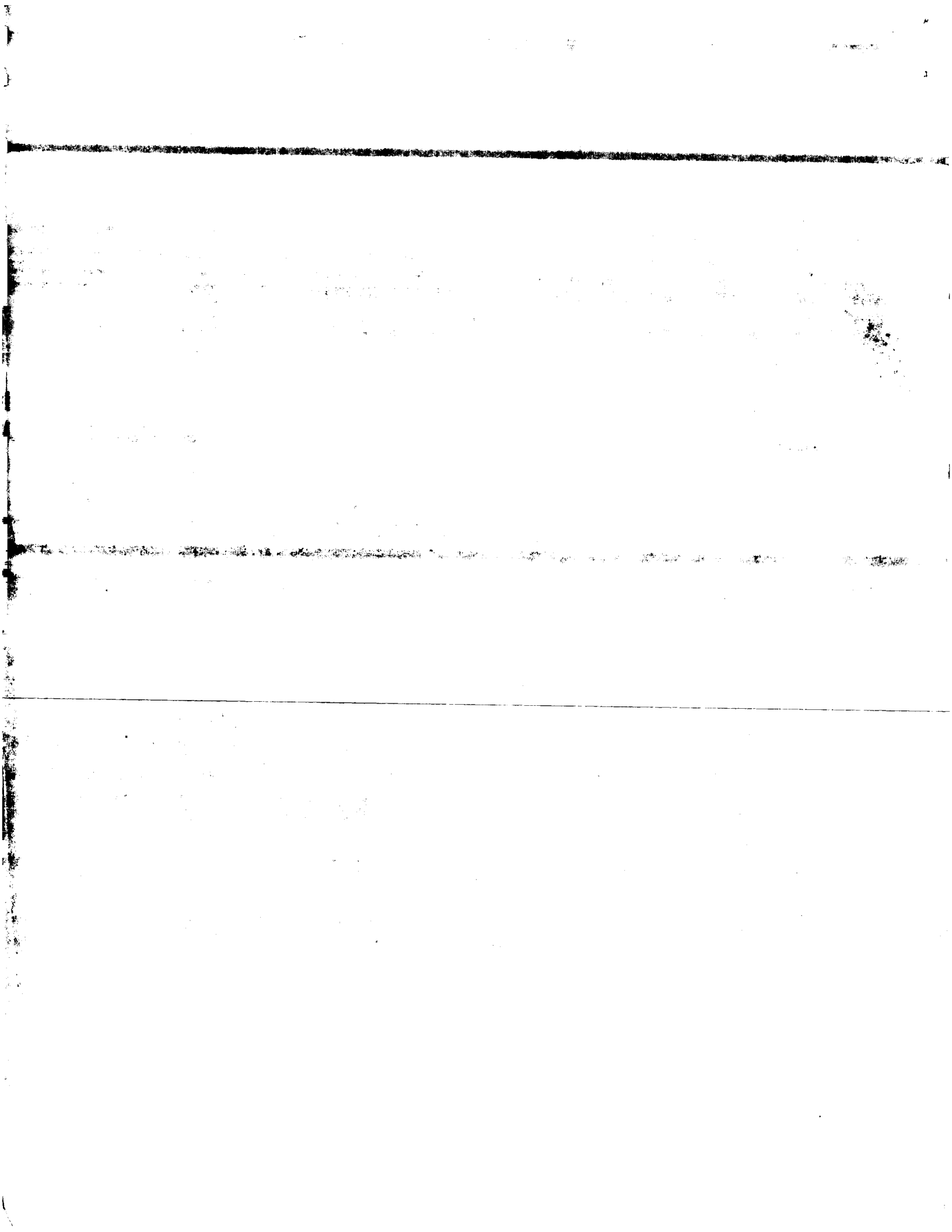
DE 19645601-A+/1

98-272943/25



(8pp2400DwgNo.0/1)

DE 19645601-A/2



**New bio-specific compound boronic acid derivatives**

Patent Number: DE19645601  
Publication date: 1998-05-07  
Inventor(s): GLUESENKAMP KARL-HEINZ DR (DE); STEINWEG DETLEF (DE); KOSEGARTEN HARALD DR (DE)  
Applicant(s): GLUESENKAMP KARL HEINZ DR (DE)  
Requested Patent: ☐ DE19645601  
Application Number: DE19961045601 19961106  
Priority Number(s): DE19961045601 19961106  
IPC Classification: C07F5/04; A01N55/08; C09B69/10; C09K11/06; A61K31/69; C08B37/00; C08B15/05; G01N1/30; C12Q1/00  
EC Classification: C07F5/02C, G01N33/532, G01N33/58  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

Boronic acid derivatives of formula (Z)kYB(OH)<sub>2</sub> (I) and (Z)k-Y-BmC' (II) are new. Y = optionally substituted, optionally unsaturated alkylidene (preferably propylidene or 2-methyltrimethylene) or substituted cyclic residue of a saturated, heterocyclic, alicyclic or aromatic (such as 1,3-phenylene or benzylene); Z = optionally substituted biospecific compound (A), preferably with one or more residues of formula -D-E coupled to it; D = substituted group as for Y; E = B(OH)<sub>2</sub>, OB(OH)<sub>2</sub> or group of formula (a); L = T or Z'; Z' = Z having vicinal substituted or unsubstituted OH groups; T = (preferably polymeric) carrier residue with vicinal substituted and/or substituted OH groups; C' = -O-T-O-; k, m = 1-10.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2





⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 45 601 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 196 45 601.0  
⑳ Anmeldetag: 6. 11. 96  
㉑ Offenlegungstag: 7. 5. 98

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 F 5/04**  
A 01 N 55/08  
C 09 B 69/10  
C 09 K 11/06  
A 61 K 31/69  
// C08B 37/00, 15/05,  
G01N 1/30, C12Q 1/00

**DE 196 45 601 A 1**

⑦ Anmelder:  
Glüsenkamp, Karl-Heinz, Dr., 45768 Marl, DE

⑦ Erfinder:  
Glüsenkamp, Karl-Heinz, Dr., 45239 Essen, DE;  
Kosegarten, Harald, Dr., 35440 Linden, DE;  
Steinweg, Detlef, 59427 Unna, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
DE 37 20 736 A1  
WO 95 02 046

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur schonenden Markierung von Geweben mit analytischen Sonden und Affinitätsliganden

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Boronsäure-Derivate und Boronsäureester-Derivate, wobei ein substituiertes Alkyliden an mindestens eine biospezifische Verbindung gekoppelt und eine Borsäure-Gruppe aufweist, an welche vorzugsweise polymere Träger verbunden sind, die Herstellung derselben und ein Verfahren zur schonenden Markierung von Trägern mit einer Vielzahl von unterschiedlichen biospezifischen Verbindungen, wie biochemischen Sonden.

**DE 196 45 601 A 1**

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Boronsäure-Derivate, Boronsäureester-Derivate, die Herstellung derselben und Verfahren zur schonenden Markierung von, vorzugsweise polymeren, Trägern mit einer Vielzahl von unterschiedlichen biospezifischen Verbindungen, wie biochemischen Sonden.

Unter Trägern wird auch im Sinne der Erfindung Träger oder Trägermaterialien wie polymere Verbindungen z. B. verschiedene Pflanzenzellen, Zellorganellen, Teile derselben, lebende oder tote Gewebe, Gewebeschnitten oder dergleichen verstanden. Unter Träger können auch die Monomere der polymeren Träger verstanden werden.

Unter biospezifischen Verbindungen oder Sonden werden im Sinne der Erfindung biochemisch wirksame Verbindungen, pharmazeutisch wirksame Verbindungen, biologisch wirksame Verbindungen und/oder diagnostisch wirksame Verbindungen verstanden.

Insbesondere versteht man unter biochemisch wirksamen Verbindungen im Sinne der Erfindung auch Proben oder Verbindungen zum qualitativen und quantitativen Nachweis, Anreicherung, Isolierung, Reindarstellung oder Erkennen von Konzentrationen, Mengen etc. eines Stoffes, einer Komponente, insbesondere des biologischen Typs oder von Milieu in Organismen oder Teilen derselben wie in Gewebe, in Organen, Zellen, Zellkompartimenten, Zell-, Gewebeextrakten etc., z. B. Farbstoffe, physiologische Indikatoren, oder ebenso pharmazeutisch wirksamen Verbindungen solche zur Behandlung von Krankheitszuständen, wie Antibiotika, Antimykotika, Enzyminhibitoren, Chelate, oder biologisch wirksamen Verbindungen, welche enzymatisch katalysierte Reaktionen in beispielsweise Zellen, Geweben, Organen, Organismen zu beeinflussen vermögen, wie Pestizide oder Herbizide, oder diagnostisch wirksamen Verbindung, welche Zellen oder Zellkompartimente eines bestimmten Status, wie entartete Zellen erkennen können bzw. an solche zu binden imstande sind, verstanden. Sonden können sein Farbstoffe, physiologische Indikatoren, Antibiotika, Antimykotika, Enzyminhibitoren, Chelate, Lipide, Tracer, Oligopeptide, Oligonukleotide, Oligosaccharide oder dergleichen bzw. die entsprechenden monomeren Bausteine.

Unter Boronsäure ist die ältere Bezeichnung für organische Derivate der Borsäure zu verstehen, entsprechendes gilt für die Bezeichnung Boronat.

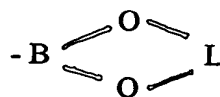
Im Stand der Technik sind cyclische Borsäureester als Schutzgruppen in der organischen Synthesechemie bekannt. Aufgabe der Erfindung ist es, Borsäureester-Derivate unter schonender Kopplungsreaktionen an biospezifische Verbindungen zu binden und diese an Träger zu koppeln, ohne daß die biologische, biochemische oder pharmazeutische Wirksamkeit der biospezifischen Verbindungen verloren, zumindest aber nicht nennenswert beeinträchtigt wird.

Die Erfindung betrifft Boronsäure-Derivate der Formel  $(Z)_k Y-B(OH)_2$ , die dadurch gekennzeichnet sind, daß Y: ein substituiertes oder unsubstituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs, vorzugsweise Propyliden oder 2-Methyltrimethylen, oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-Phenylen oder Benzyl-, ist, sowie

Z: eine substituierte oder unsubstituierte biospezifische Verbindung ist, an welcher vorzugsweise ein oder mehrere Reste der Formel  $(-D-E)$  gekoppelt sind, worin

D: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs oder ein sub-

stituierter cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-Phenylen oder Benzyl-, und E:  $-B(OH)_2$  oder  $-O-B(OH)_2$  oder

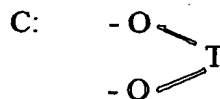


sind, worin L gleich T oder Z, wobei Z benachbarte substituierte oder unsubstituierte OH-Gruppen aufweist,

T: ein, vorzugsweise polymerer, Trägerrest mit benachbarten substituierten und/oder unsubstituierten OH-Gruppen sind, und

k eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf ein Boronsäureester-Derivate der Formel  $[(Z)_k Y-B]_m C$ , die dadurch gekennzeichnet sind, daß



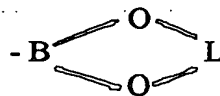
T: ein, vorzugsweise polymerer, Trägerrest mit benachbarten substituierten und/oder unsubstituierten OH-Gruppen,

Y: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs, vorzugsweise Propyliden, oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-Phenylen oder Benzyl-,

Z eine substituierte oder unsubstituierte biospezifische Verbindung sind, an welcher vorzugsweise eine oder mehrere Reste der Formel  $(-D-E)$  gekoppelt sind, worin

D: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs, vorzugsweise Propyliden oder 2-Methyltrimethylen, oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere ein Arylen, wie 1,3-Phenylen oder Benzyl-, und

E:  $-B(OH)_2$  oder  $-O-B(OH)_2$  oder



sind,

worin L gleich T oder Z ist, wobei Z benachbarte substituierten oder unsubstituierten OH-Gruppen aufweist,

k eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und

m eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Boronsäure-Derivate, zur schonenden Markierung von, vorzugsweise polymeren, Trägern mit biospezifischen Verbindungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß

a) die biospezifische Verbindung in einem Ansatz mit einem substituierten Boronsäure-Derivat, vorzugsweise bei Raumtemperatur, in einem polaren Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, und einer Base, wie Triethylamin, 1 bis 5 Stunden lang inkubiert wird,

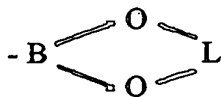
- b) anschließend zur Fällung der substituierten biospezifischen Verbindung ein organisches Lösungsmittel als Fällungsmittel, insbesondere Ether, zu dem Ansatz gegeben wird,  
c) die gefällte substituierte biospezifische Verbindung getrocknet wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auf ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Boronsäureester-Derivate gerichtet, zur schonenden Markierung von, vorzugsweise polymeren, Trägern mit biospezifischen Verbindungen, wobei

- a) die biospezifische Verbindung in einem Ansatz mit einem substituierten Boronsäure-Derivat, vorzugsweise bei Raumtemperatur, in einem polaren Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, und einer Base, vorzugsweise Triethylamin, 1 bis 5 Stunden lang inkubiert wird,  
c) anschließend zur Fällung der substituierten biospezifischen Verbindung Ether zu dem Ansatz gegeben wird,  
d) die gefällte substituierte biospezifische Verbindung getrocknet wird und  
e) anschließend mit einem, vorzugsweise polymeren, Träger mit benachbarten Hydroxyl-Gruppen, vorzugsweise bei Raumtemperatur, bei pH 6 bis 8, vorzugsweise pH 7, verestert wird. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auf eine Verwendung der erfindungsgemäßen Boronsäure-Derivate als biologisch wirksame Verbindung, als biochemisch wirksame Verbindung, pharmazeutisch wirksame Verbindung oder als diagnostisch wirksame Verbindung gerichtet und auf eine Verwendung der erfindungsgemäßen Boronsäureester-Derivate gerichtet als biologisch wirksame Verbindung, biochemisch wirksame Verbindung, pharmazeutisch wirksame Verbindung oder als diagnostisch wirksame Verbindung.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Boronsäure-Derivate können als Alkyliden bivalente Gruppen wie Ethyliden, Propyliden, Tetramethylen, 2-Methyltrimethylen oder 2, 2-Dimethyltrimethylen sein. Diese können weiter substituiert sein. Als Arylen sind bivalente aromatische Gruppen wie 1,2-Phenylen, 1,3-Phenylen, 1,4-Phenylen, oder auch substituierte bivalent aromatische Gruppen wie 4-Methyl-1,3-Phenylen, 4-Amino-1, 3-Phenylen.

Im Falle der substituierten Boronat-Gruppe, wenn E gleich



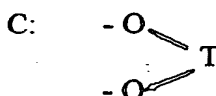
ist, steht L beispielsweise für einen polymeren Trägerrest oder für eine biospezifische Verbindung Z, wobei Sauerstoff an vicinalen Kohlenstoffatomen des Trägerrestes bzw. der biospezifischen Verbindung, nicht an geminalen, kovalent gebunden ist.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Boronsäure-Derivate der Formel  $Z-Y-B(OH)_2$  kann Y: für 1,3-Phenylen, 1-Imino-3-Phenyl, Z: eine substituierte biospezifische Verbindung stehen; weiterhin kann die biospezifische Verbindung über die Imino-Gruppierung an dem Phenyl-Rest in 3-Position oder über beispielsweise Isothiocyanato-Gruppierung an die am Phe-

nyl verbundene Imino-Gruppe kovalent gekoppelt sein.

Zudem ist es möglich bei den erfindungsmäßen Boronsäure-Derivate, daß die biospezifische Verbindung mindestens ein Vertreter der eine biologisch wirksame Verbindung, eine pharmazeutisch wirksame Verbindung, eine biochemisch wirksame Verbindung und eine diagnostisch wirksame Verbindung umfassenden Gruppe ist. Die biologisch wirksamen Verbindungen können Enzyminhibitoren, Herbizide oder Pestizide, die pharmazeutisch wirksamen Verbindungen ein Antibiotikum oder Antimykotikum sein. Der polymere Trägerrest kann Pflanzenzellen, Zellorganellen, Teile derselben, Gewebe, Gewebeschnitten oder dergleichen sein.

Die erfindungsgemäßen Boronsäureester-Derivate der Formel  $(Z)_k Y-B C$  können dadurch gekennzeichnet sein, daß



k eine ganze Zahl von 1 bis 5,

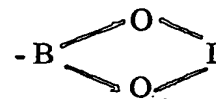
T: ein, vorzugsweise polymerer, Trägerrest mit benachbarten substituierten und/oder unsubstituierten OH-Gruppen,  
Y: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen,

wie 1,3-Phenylen oder Benzylen,

Z eine substituierte oder unsubstituierte biospezifische Verbindung sind, an welcher vorzugsweise eine oder mehrere Reste der Formel  $(-D-E)$  gekoppelt sind, worin

D: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-Phenylen,

E  $-R(OH)_2$  oder  $-O-B(OH)_2$  oder



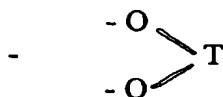
sind,

50 worin L gleich T oder Z ist, wobei Z benachbarte substituierte oder unsubstituierte OH-Gruppen aufweist.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Boronsäureester-Derivate können als Alkyliden bivalente Gruppen wie Ethyliden, Propyliden, Tetramethylen, 2-Methyltrimethylen oder 2,2-Dimethyltrimethylen sein. Diese können weiter substituiert sein. Als Arylen sind bivalente aromatische Gruppen wie 1,2-Phenylen, 1,3-Phenylen, 1,4-Phenylen, oder auch substituierte bivalent aromatische Gruppen wie 4-Methyl-1,3-Phenylen, 4-Amino-1,3-Phenylen.

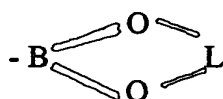
60 In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Boronsäureester-Derivate können

Y für 1,3-Phenylen, 1-Imino-3-Phenyl und Z für eine substituierte biospezifische Verbindung stehen; weiterhin kann die biospezifische Verbindung über die Imino-Gruppierung an dem Phenyl-Rest in 3-Position oder über beispielsweise mittels Isothiocyanato-Gruppierung an die am Phenyl verbundene Imino-Gruppe kovalent gekoppelt sein. Im Falle der substituierten Boronat-Gruppe, wenn C gleich



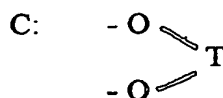
ist, steht T beispielsweise für einen polymeren Trägerrest, wobei Sauerstoff an vicinalen Kohlenstoffatomen des Trägerrestes, nicht an geminalen, kovalent gebunden ist.

Ebenso wenn E gleich



ist, steht L beispielsweise für einen polymeren Trägerrest T oder für eine biospezifische Verbindung Z, wobei Sauerstoff an vicinalen Kohlenstoffatomen des Trägerrestes bzw. der biospezifischen Verbindung, nicht an geminalen, kovalent gebunden ist.

Ebenso ist es möglich, daß



T: ein polymerer Trägerrest mit benachbarten substituierten und/oder unsubstituierten OH-Gruppen,

Y: 1,3-Phenylen und

Z eine substituierte biospezifische Verbindung sind.

Weiterhin kann in einer besonderen Ausführungsform die biospezifische Verbindung mindestens ein Vertreter der eine biologisch wirksame Verbindung, eine pharmazeutisch wirksame Verbindung, eine biochemisch wirksame Verbindung und eine diagnostisch wirksame Verbindung umfassenden Gruppe sein. Als biologisch wirksame Verbindungen eignen Enzyminhibitoren, Herbizide oder Pestizide, als pharmazeutisch wirksame Verbindungen ein Antibiotikum oder Antimykotikum und als polymere Trägerrest Pflanzenzellen, Zellorganellen, Teile derselben, Gewebe, Gewebeschnitten oder dergleichen. Vorzugsweise ist die biospezifische Verbindung mindestens ein Farbstoff, vorzugsweise substituiertes Fluorescein.

In einer besonderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Boronsäureester-Derivate kann die biospezifische Verbindung mindestens ein Vertreter der biochemisch, wie ein Farbstoff, ein physiologischer Indikator, eine biologisch, diagnostisch und/oder pharmazeutisch wirksame Verbindung, Chelate, Lipide, Tracer, Oligopeptide, Oligonukleotide, Oligosaccharide oder dergleichen umfassenden Gruppe sein, wobei beispielsweise die biologisch, insbesondere Enzyminhibitoren, oder pharmazeutisch wirksame Verbindung, insbesondere ein Antibiotikum, Antimykotikum, sein können. Hinzukommend kann der polymere Träger Pflanzenzellen, Zellorganellen, Teile derselben, Gewebe, Gewebeschnitten oder dergleichen oder substituierte Lectine, Nukleinsäure-Derivate oder dergleichen sein. Jedoch kann der Träger auch ein Monomer des polymeren Trägers oder die biospezifische vicinale Hydroxyl-Gruppen aufweisende Verbindung sein.

Die chemischen Bindungen zwischen den Trägern und den Sonden sind cyclische Borsäureester mit einer überraschend hohen Stabilität unter physiologischen Bedingungen. Eine Voraussetzung für diese Verknüpfung kann sein,

daß der polymere Träger benachbarte Hydroxyl-Gruppen (vicinale Diolgruppen) enthält und der Ligand mindestens eine Boronsäure-Gruppe mit einem organischen Rest, welcher z. B. aus der Acylen, Aromaten, Alicylen, wie Cycloalkane, Cycloalkene, Cycloalkine, und Heterocylen wie 5- oder 6- Ringheterocylen umfassenden Gruppe ausgewählt ist umfaßt. Vorzugsweise kann die substituierte Boronsäure-Gruppe als organischen Rest ein Alkyl des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten-unverzweigten oder ungesättigt-verzweigten Typs, ein cyclischer Rest des gesättigten oder aromatischen Typs wie Phenylboronsäure-Gruppen sein.

Da Zellen, wie z. B. Pflanzenzellen eine Vielzahl von polymeren Kohlenhydraten mit freien, vicinalen Diolgruppen enthalten, ist eine gezielte Markierung mit Borsäurederivaten möglich. Ein weiterer, neben der unerwartet hohen Stabilität der Bindung, hervorzuhebender Vorteil gegenüber gängigen Immobilisierungsmethoden ist die sehr schonende Kopplungschemie, die es überraschenderweise erlaubt, z. B. bei pH 7.0 und in physiologischen Puffersystemen Markierungen durchzuführen.

Cyclische Borsäureester sind als Schutzgruppen in der Organischen Synthesechemie bekannt (Th. W. Greene; P.G.M. Wuts: Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition, John Wiley & Sons, 1991, S. 141 ff). Völlig neu aber ist der Einsatz von Borsäure-Derivaten zur gezielten Immobilisierung von analytischen Sonden an z. B. Zellkompartimente. Die überraschenderweise sehr selektive Kopplungschemie eröffnet ein nicht vorhersehbares, außerordentlich breites Anwendungsspektrum. Das chemoselektive Reaktionsverhalten dieser Borsäure-Derivate erlaubt es, neuartige Verbindungen herzustellen, die z. B. für die kompartimentspezifische Markierung von Pflanzenzellwänden bedeutsam werden können. Es ist literaturbekannt, daß die Molekülgröße maßgeblich die Eindringtiefe in Geweben bestimmt. Darüberhinaus ist bekannt, daß viele Zellkompartimente von Membranen umgeben sind, die nur Moleküle bis zu einem bestimmten Molekulargewicht wie z. B. 10 kD passieren lassen. Maßgeschneiderte Sonden mit unterschiedlichen Molekulargewichten machen so eine kompartimentspezifische Markierung möglich, die zum Studium von Membraneigenschaften, wie z. B. pH-Messung und/oder auch Messung von Ionenströmen, wie z. B.  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Transport geeignet sind. Außerdem ist es möglich, verschiedene analytische Sonden miteinander zu kombinieren, um verschiedenen Parameter wie z. B. pH-Wert und  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration gleichzeitig zu quantifizieren.

Abb. 1 zeigen beispielhaft: das Reaktionsverhalten einer maßgeschneiderten Sonde in

**Fig. 1a)** die substituierte biospezifische Verbindung hier Fluorescein-Boronsäure-Derivat (hier Addukt 1)  
b) das stabile Fluorescein-Boronsäureester-Derivat (hier Addukt 2).

Das Fluorescein-Boronsäure Addukt 1 (Abb. 1a) kann mit benachbarten Hydroxylgruppen von z. B. Zellwänden unter physiologischen Bedingungen zum stabilen cyclischen Boronsäureester-Derivat 2 (Abb. 1b) unter Wasserabspaltung reagieren. Das so gebundene Fluorescein stellt eine analytische Sonde für die  $\text{H}^+$ -Ionen Konzentration dar, da diese Verbindung eine pH-abhängige Fluoreszenz aufweist.

Das nachfolgende Ausführungsbeispiel zeigt lediglich eine Ausgestaltung der Erfindung.

#### Synthese- und Ausführungsbeispiele

##### 1. Herstellung des Adduktes 1 (in Abb. 1a)

0.173 g (0.001 Mol) Aminobenzolboronsäure-Hydro-



chlorid (Fa. Aldrich) und 0.389 g (0.001 Mol) Fluoresceini-  
sothiocyanat (=FTTC) (Fa. Aldrich) werden in 20 ml Dime-  
thylformamid eingerührt und 1 Äquivalent Triethylamin  
hinzugefügt. Nach 5 h wird das Addukt 1 in Ether gefällt,  
mit Ether gewaschen und anschließend getrocknet. Aus-  
beute: 0.5 g (93%).  
HPLC: Rt: = 27.5 min; 0.01 M Ammoniumformiat pH 5,  
Methanol; 100 bis 0% (30 min).

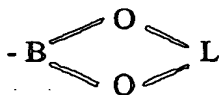
## 2. FTTC-Markierung von Pflanzenzellen

Herstellung des Adduktes 2 (Abb. 1b; FTTC-Markierung  
von Pflanzenzellen): Ausgesuchte Wurzeln von 2 Wochen  
alten prekultivierten Weizenkeimen wurden auf Objektträger  
plaziert und anschließend sofort mit 2% Agamärlösung  
(PMS= Phosphat gepufferte Kochsalz-Lösung) bedeckt. Pro-  
ben dieser Zellen wurden bei verschiedenen Temperaturen  
mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen vom Addukt 1  
(10 bis 100 Mmolar in PBS) und als Kontrolle mit dem ent-  
sprechenden nicht derivatisiertem Fluorescein für 1 bis 12 h  
im dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben nach aus-  
giebigem Waschen mit einem konfokalen Lasermikroskop  
(Anregung 490 nm, Fluoreszenz bei 600 nm) miteinander  
verglichen. Die Proben, die mit dem Addukt 1 inkubiert  
wurden, zeigten ein stabiles Fluoreszenzsignal. Im Gegen-  
satz dazu wiesen die Proben, die mit nicht markiertem FTTC  
behandelt wurden keine stabile Fluoreszenz auf

Abb. 1 zeigt beispielhaft das Reaktionsverhalten einer  
maßgeschneiderten Sonde.

## Patentansprüche

1. Boronsäure-Derivate der Formel  $(Z)_k Y-B(OH)_2$ ,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
Y: ein substituiertes oder unsubstituiertes Alkyliden  
des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten  
oder ungesättigten Typs, vorzugsweise Propyliden oder  
2-Methyltrimethylen, oder ein substituiertes cyclischer  
Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen  
oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-  
Phenylen oder Benzylen, ist, sowie  
Z: eine substituierte oder unsubstituierte biospezifische  
Verbindung ist, an welcher vorzugsweise ein oder meh-  
rere Reste der Formel  $(-D-E)$  gekoppelt sind, worin  
D: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unver-  
zweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten  
Typs oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesät-  
tigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromati-  
schen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-Phenylen  
oder Benzylen, und  
E:  $-B(OH)_2$  oder  $-O-B(OH)_2$  oder



- sind, worin L gleich T oder Z, wobei Z benachbarte  
substituierte oder unsubstituierte OH- Gruppen auf-  
weist,  
T: ein, vorzugsweise polymerer, Trägerrest mit benach-  
barten substituierten und/oder unsubstituierten OH-  
Gruppen sind, und  
k eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist.  
2. Boronsäure-Derivate der Formel  $Z-Y-B(OH)_2$  nach  
Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
Y: 1,3-Phenylen sowie

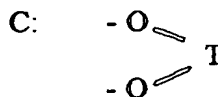
Z: eine substituierte biospezifische Verbindung sind.  
3. Boronsäure-Derivate nach Anspruch 1 oder 2, da-  
durch gekennzeichnet, daß die biospezifische Verbin-  
dung mindestens ein Vertreter der eine biologisch wirk-  
same Verbindung, eine pharmazeutisch wirksame Verbin-  
dung, eine biochemisch wirksame Verbindung und eine  
diagnostisch wirksame Verbindung umfassenden  
Gruppe ist.

4. Boronsäure-Derivate nach Anspruch 3, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß die biologisch wirksame Verbindung  
Enzyminhibitoren, Herbizide oder Pestizide ist.

5. Boronsäure-Derivate nach Anspruch 3 oder 3, da-  
durch gekennzeichnet, daß die pharmazeutisch wirk-  
same Verbindung ein Antibiotikum oder Antimykoti-  
kum ist.

6. Boronsäure-Derivate nach einem der Ansprüche 1  
bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der polymere Trä-  
gerrest Pflanzenzellen, Zellorganellen, Teile derselben,  
Gewebe, Gewebeschnitten oder dergleichen ist.

7. Boronsäureester-Derivate der Formel  $[(Z)_k Y-B]_m C$ ,  
dadurch gekennzeichnet, daß



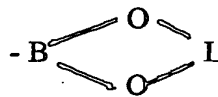
T: ein, vorzugsweise polymerer, Trägerrest mit benach-  
barten substituierten und/oder unsubstituierten OH-  
Gruppen,

Y: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unver-  
zweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten  
Typs, vorzugsweise Propyliden, oder ein substituiertes  
cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, ali-  
cyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere Ary-  
len, wie 1,3-Phenylen oder Benzylen,

Z eine substituierte oder unsubstituierte biospezifische  
Verbindung sind, an welcher vorzugsweise eine oder  
mehrere Reste der Formel  $(-D-E)$  gekoppelt sind, wo-  
rin

D: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unver-  
zweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten  
Typs, vorzugsweise Propyliden oder 2-Methyltrime-  
thylen, oder ein substituiertes cyclischer Rest des ge-  
sättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromati-  
schen Typs, insbesondere ein Arylen, wie 1,3-Phenylen  
oder Benzylen, und

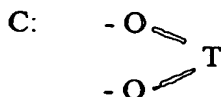
E:  $-B(OH)_2$  oder  $-O-B(OH)_2$  oder



sind, worin L gleich T oder Z ist, wobei Z benachbarte  
substituierten oder unsubstituierten OH- Gruppen auf-  
weist,

k eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und  
m eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist.

8. Boronsäureester-Derivate der Formel  $(Z)_k Y-B C$   
nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß



k eine ganze Zahl von 1 bis 5,

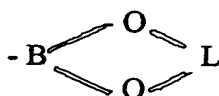
T: ein, vorzugsweise polymerer, Trägerrest mit benachbarten substituierten und/oder unsubstituierten OH-Gruppen,

Y: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-Phenylen oder Benzylen,

Z eine substituierte oder unsubstituierte biospezifische Verbindung sind, an welcher vorzugsweise eine oder mehrere Reste der Formel (-D-E) gekoppelt sind, worin

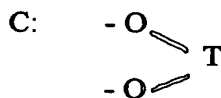
D: ein substituiertes Alkyliden des gesättigt-unverzweigten, gesättigt-verzweigten oder ungesättigten Typs oder ein substituiertes cyclischer Rest des gesättigten, heterocyclischen, alicyclischen oder aromatischen Typs, insbesondere Arylen, wie 1,3-Phenylen,

E:  $-B(OH)_2$  oder  $-O-B(OH)_2$  oder



sind, worin L gleich T oder Z ist, wobei Z benachbarte substituierte oder unsubstituierte OH-Gruppen aufweist,

9. Boronsäureester-Derivate der Formel Z-Y-B C nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß



T: ein polymerer Trägerrest mit benachbarten substituierten und/oder unsubstituierten OH-Gruppen, 1,3-Phenylen und

Z eine substituierte biospezifische Verbindung sind.

10. Boronsäureester-Derivate nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die biospezifische Verbindung mindestens ein Vertreter der eine biologisch wirksame Verbindung, eine pharmazeutisch wirksame Verbindung, eine biochemisch wirksame Verbindung und eine diagnostisch wirksame Verbindung umfassenden Gruppe ist.

11. Boronsäureester-Derivate nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch wirksame Verbindung Enzyminhibitoren, Herbizide oder Pestizide ist.

12. Boronsäureester-Derivate nach einem der Ansprüche 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die pharmazeutisch wirksame Verbindung ein Antibiotikum oder Antimykotikum ist.

13. Boronsäureester-Derivate nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der polymere Trägerrest Pflanzenzellen, Zellorganellen, Teile

derselben, Gewebe, Gewebeschnitten oder dergleichen ist.

14. Boronsäureester-Derivate nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die biospezifische Verbindung mindestens ein Farbstoff, vorzugsweise substituiertes Fluorescein, ist.

15. Verfahren zur Herstellung der Boronsäure-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 6, zur schonenden Markierung von, vorzugsweise polymeren, Trägern mit biospezifischen Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß

a) die biospezifische Verbindung in einem Ansatz mit einem substituierten Boronsäure-Derivat, vorzugsweise bei Raumtemperatur, in einem polaren Lösungsmittel und einer Base, vorzugsweise Triethylamin, 1 bis 5 Stunden lang inkubiert wird,

b) anschließend zur Fällung der substituierten biospezifischen Verbindung Ether zu dem Ansatz gegeben wird und

c) die gefällte substituierte biospezifische Verbindung getrocknet wird.

16. Verfahren zur Herstellung der Boronsäureester-Derivate nach einem der Ansprüche 7 bis 14, zur schonenden Markierung von, vorzugsweise polymeren, Trägern mit biospezifischen Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß

a) die biospezifische Verbindung in einem Ansatz mit einem substituierten Boronsäure-Derivat, vorzugsweise bei Raumtemperatur, in einem polaren Lösungsmittel und einer Base, vorzugsweise Triethylamin, 1 bis 5 Stunden lang inkubiert wird,

c) anschließend zur Fällung der substituierten biospezifischen Verbindung Ether zu dem Ansatz gegeben wird,

d) die gefällte substituierte biospezifische Verbindung getrocknet wird und

e) anschließend mit einem, vorzugsweise polymeren, Träger mit benachbarten Hydroxyl-Gruppen, vorzugsweise bei Raumtemperatur, bei pH 6 bis 8, vorzugsweise pH 7, verestert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß 0.1 bis 40 mMol, vorzugsweise 1 bis 20 mMol, am bevorzugtesten 0.5 bis 5 mMol, biospezifische Verbindung in einem Ansatz mit 0.1 bis 40 mMol, vorzugsweise 1 bis 20 mMol, am bevorzugtesten 0.5 bis 5 mMol, substituiertes Boronsäure-Derivat in 5 bis 40 ml polarem Lösungsmittel und 0.1 bis 10, bevorzugterweise 1 bis 5, Äquivalent Triethylamin 1 bis 5 Stunden lang inkubiert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß 1 mMol biospezifische Verbindung in einem Ansatz mit 1 mMol substituiertes Boronsäure-Derivat in 20 ml polarem Lösungsmittel und 1 Äquivalent Triethylamin 5 Stunden lang inkubiert wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß als polares Lösungsmittel Dimethylformamid verwendet wird.

20. Verwendung der Boronsäure-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als biologisch wirksame Verbindung, als biochemisch wirksame Verbindung, pharmazeutisch wirksame Verbindung oder als diagnostisch wirksame Verbindung.

21. Verwendung der Boronsäureester-Derivate nach einem der Ansprüche 7 bis 14 als biologisch wirksame Verbindung, biochemisch wirksame Verbindung, pharmazeutisch wirksame Verbindung oder als diagno-

stisch wirksame Verbindung.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

.

60

65

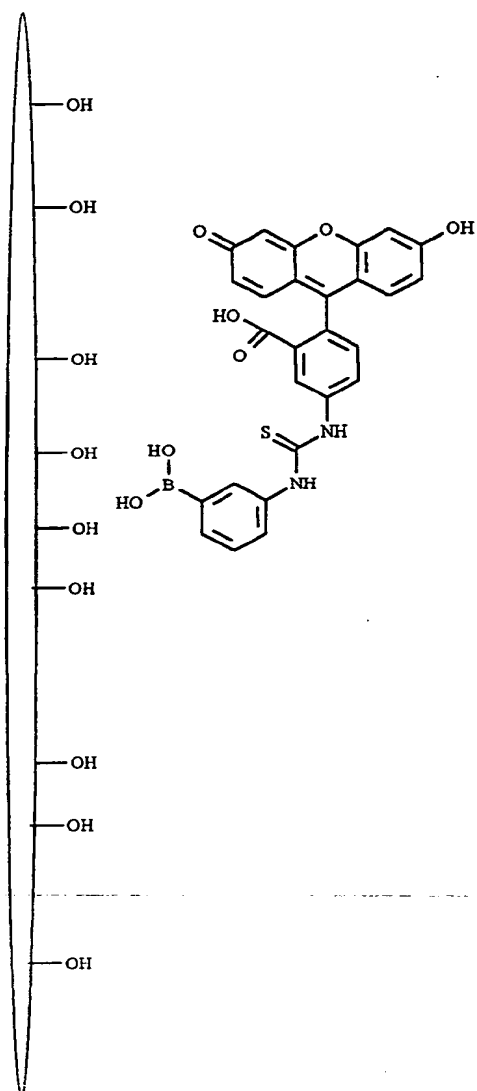


Abbildung 1a

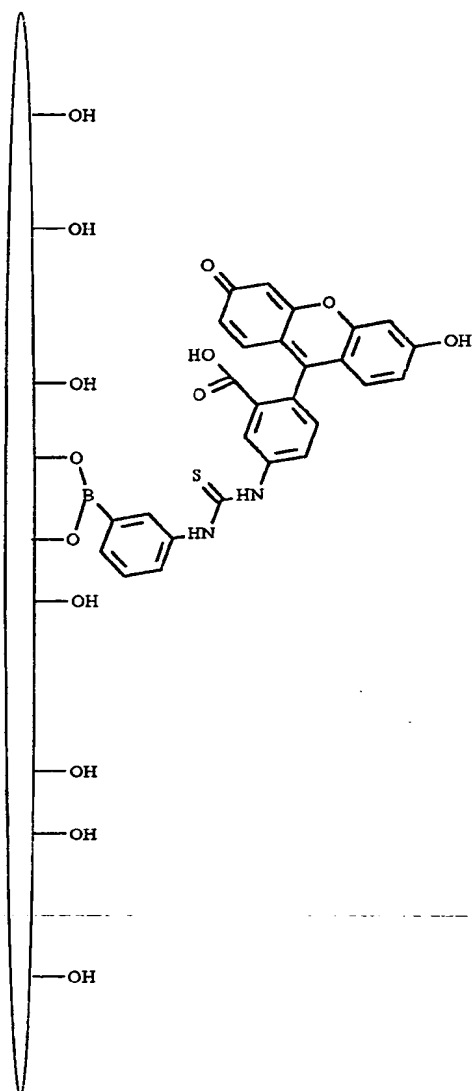


Abbildung 1b